コスモ・バイオ株式会社

研究用試薬

YK180　Estrone　EIA

（環境水・アロマターゼバイオアッセイ培養液用）

取　扱　説　明　書

FOR　RESEARCH　LABORATORY　USE　ONLY

株式会社　　矢内原研究所

〒418-0011　静岡県富士宮市粟倉 2480-1

FAX: 0544-22-2770　TEL: 0544-22-2771

Website: www.yanaihara.co.jp　E-mail: ask@yanaihara.co.jp

目　　次

Ⅰ.	はじめに	2〜3
Ⅱ.	特　　徴	4
Ⅲ.	キットの構成	5
Ⅳ.	操作法	6? 7
Ⅴ.	操作上の注意	8
Ⅵ.	基本性能	9〜12
Ⅶ.	貯蔵法および有効期間	12
Ⅷ.	文献	12〜13

YK180: Estrone EIA キット（環境水・アロマターゼバイオアッセイ培養液用）

Ⅰ． はじめに

ヒトのエストロゲンには20種類以上のものが知られていますが、そのうちの１つであるエストロンは女性ホルモンとして性機能の発達と妊娠機能に深く関与しています。エストロゲンを合成する酵素の１つであるアロマターゼは、コレステロールから性ホルモンを作る経路においてアンドロステンジオンをエストロンに可逆的に変換する酵素であり、性ホルモンのバランスの調節に重要な役割を果たしています。近年、このアロマターゼに何らかの影響を与えることによって女性ホルモンの合成そのものに影響を与え、性分化や生殖機能の異常を引き起こす環境ホルモンの存在が知られるようになりました（アトラジン、有機スズなど）。さらに、河川水や排水などの環境水中にもエストロンなどの女性ホルモンが検出され、魚類が生殖異変を起こしていることが問題となっています。こうしたことからアロマターゼ活性を利用した環境ホルモンのスクリーニング法が用いられるようになりました。実際には、ヒト卵巣顆粒膜細胞株KGN細胞にアンドロステンジオンを添加し、アロマターゼの作用によって変換・生成するエストロンをエストロンEIAキットにより測定する方法や遊離〔^{3}H〕H_2Oの放射活性を測定する方法があります。これらの方法ではアンドロステンジオンから変換・生成したエストロン量を測定することにより、アロマターゼ活性に対する影響を間接的に判断できます。しかしながら、エストロンEIAキットについてはこれまでアンドロステンジオンやテストステロンとの交差反応性によりバックグランドが高いなどの問題があり、また、遊離〔^{3}H〕H_2Oの放射活性を測定する方法については放射性同位体(RI)を使用しなければならない上、測定に煩雑な操作と時間を要するのでスクリーニングに適したものとはいえませんでした。そこで、弊社では今回、非放射性測定系で抗体の特異性によりバックグランドの問題などを解決した新しいエストロンEIAキットを開発いたしました。本キットはアンドロステンジオンやテストステロンとの交差反応性が極めて低く、河川水や排水などの環境水中のエストロンを特異的かつ高感度に測定できます。さらに、培養液中におけるアロマターゼ反応の生成物の１つであるエストロンについても測定することが可能です。

YK180 Estrone EIA キット（環境水・アロマターゼバイオアッセイ培養液用）

▼ エストロン（環境水・アロマターゼバイオアッセイ培養液）測定用です。

▼ 4.8～5000 pg/mL の範囲で測定できます。

▼ 41 検体を duplicate で測定できます。

▼ 測定は 17～19 時間（4℃）と 4 時間で終了します。

▼ 環境水および培養液サンプルの測定ができます。

▼ 検体量は 100 µL です。

▼ プレートは 1 列（8 ウエル）毎に取り外しできますのでキットの分割使用が可能です。

内容

1) 測定プレート
2) 標準品
3) 標識抗原
4) 特異抗体
5) SA-HRP 溶液
6) 基質溶解液
7) OPD 錠
8) 酵素反応停止液
9) 緩衝液
10) 濃縮洗浄液
11) プレート密閉用シール

保存と安定性　2～8℃で保存してください。
製造日より 24 ヶ月間は安定です。

Ⅱ．特　　徴

本キットは環境水中に含まれるエストロン濃度及びアロマターゼバイオアッセイにおける培養液中のエストロン濃度を定量的に測定するためのものです。本キットによるエストロンの測定は簡便でしかも特異性、定量性に優れ、培養液中に共存する他の成分の影響を受けにくいなど多くの利点を備えています。なお、表示の重量は絶対量を示しております。

＜特異性＞

本キットは 17β-エストラジオールに対して 30.6%の交差反応性が認められますが、エストリオール、テストステロン、プロゲステロンおよび 4-アンドロステン-3,17-ジオンに対してはほとんど交差反応性が認められません。

＜測定原理＞

本キットによるエストロンの測定は競合法に基づいて行ないます。測定プレート(96 ウエル)の各ウエルにはヤギ抗ウサギ IgG 抗体が固定化されています。この各ウエルにビオチン化エストロン、標準液または検体、ウサギ抗エストロン抗体を順次加えて競合反応させます。これに HRP 結合ストレプトアビジンを加え、ウエル上に HRP 結合ストレプトアビジン-ビオチン化抗原-抗体複合体を形成させます。最後にこの複合体中の HRP 活性を測定することにより、検体中のエストロン濃度を求めることができます。

Ⅲ. キットの構成

試薬・器具	形状	規格		内容物
1．測定プレート		96 ウエルプレート 1 枚		ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 固定化プレート
2．標準品	凍結乾燥品	400 ng	1 本	エストロン（ごく微量ですので目には見えません）
3．標識抗原	凍結乾燥品		1 本	ビオチン化エストロン
4．特異抗体	凍結乾燥品		1 本	ウサギ抗エストロン抗体
5．SA-HRP 溶液	液状	12 mL	1 本	安定剤を含むﾄﾘｽ塩酸緩衝液に溶解した HRP 結合ストレプトアビジン
6．基質溶解液	液状	24 mL	1 本	0.015% 過酸化水素を含む 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 5.0)
7．OPD 錠	錠剤		2 錠	o-フェニレンジアミン
8．酵素反応停止液	液状	12 mL	1 本	1M 硫酸溶液
9．緩衝液	液状	25 mL	1 本	非特異的反応除去剤を含むリン酸緩衝液
10．濃縮洗浄液	液状	50 mL	1 本	1% Tween 20 を含む濃縮生理食塩液
11．プレート密閉用シール		3 枚		

Ⅳ. 操作法

測定を始める前に必ずお読みください。(注意：キットに含まれるすべての試薬は室温に戻してから測定を始めてください。)

＜使用器具および装置＞

1. マイクロピペットおよびチップ（25 μL～1 mL)；8 連または 12 連のマルチチャンネルピペットの使用を薦めます
2. マイクロプレート用吸光度計(測定波長 492 nm で吸光度 2.5 まで測定できる装置)
3. マイクロプレート用振とう機またはシェーカー
4. 標準液の調製に使用するポリプロピレン製の試験管またはガラス試験管
5. マイクロプレート洗浄装置、用手法の場合は連続分注器、ニードルディスペンサー、アスピレーターまたは真空ポンプの使用を薦めます
6. メスシリンダー(1000 mL)
7. 蒸留水または脱イオン水

＜試薬の調製＞

1. 標準液の調製法：標準品の容器に 70%エタノール（非添付）1 mL を加え内容物を溶解させる。この溶液 0.1 mL をとり、これを緩衝液 7.9 mL で希釈し 5,000 pg/mL の標準液を調製する。この標準液 0.2 mL をとり、これを緩衝液 0.6 mL で希釈し 1,250 pg/mL の標準液を調製する。以下同様の希釈操作を繰り返し、312.5、78.1、19.5、4.8 pg/mL の各標準液を調製する。0 pg/mL の標準液は緩衝液をそのまま使用する。

   ※＜測定範囲＞　有効測定範囲　4.8 pg/mL～5,000 pg/mL

   4.8 pg/mL を下回るような低値の検体が予想される場合、検出限度としてさらに 4.8 pg/mL の標準液を４倍希釈し、1.2 pg/mL の標準液を設けることができます。この場合、1.2 pg/mL～4.8 pg/mL の範囲の測定値の精度は上記有効測定範囲ほど高くはありませんので、概算値として使用してください。
2. 標識抗原溶液の調製法：標識抗原の容器に蒸留水 6 mL を加え内容物を溶解させ使用する。
3. 特異抗体溶液の調製法：特異抗体の容器に蒸留水 6 mL を加え内容物を溶解させ使用する。

4. 発色剤溶液の調製法：使用時に基質溶解液 11 mL に OPD 錠 1 錠を加え溶解させ使用する。
5. 洗浄液の調製法：濃縮洗浄液 50 mL (全量)を蒸留水 950 mL にて希釈し使用する。
6. その他の試薬はそのまま＜測定操作＞に従って使用する。

＜測定操作＞

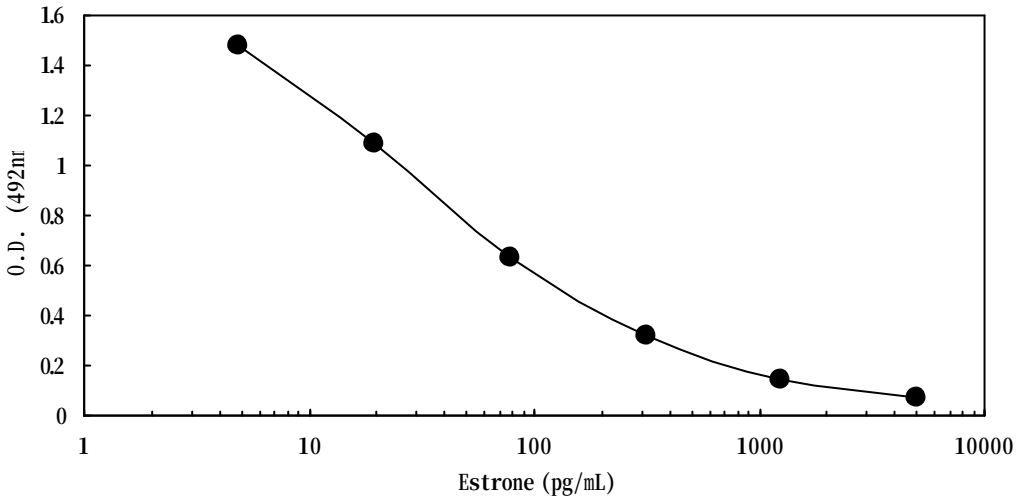
1. キット内容を室温(20? 30℃)に戻す。
   標準液、標識抗原溶液、特異抗体溶液および洗浄液を上記の試薬調製法に従って調製する。
2. 各ウエルに、洗浄液 350 μL を満たした後、アスピレ-ターにより吸引するか、あるいはプレートを反転し液を捨てたあと、紙タオルなどに軽くたたきつけるようにして液を除く。この操作をさらに 2 回繰り返し、合計 3 回の洗浄操作を行なう。
3. 各ウエルに標識抗原溶液 50 μL を入れ、ついで標準液または検体 100 μL を加え、さらに特異抗体溶液 50 μL を加える。
4. 測定プレートをプレート密閉用シールでシールし、4℃で一晩（17～19 時間）静置する。
5. 測定プレートを室温に戻した後（約 1 時間)、各ウエル中の液を除き、2. と同様の洗浄操作を合計 4 回行なう。
6. 各ウエルに SA-HRP 溶液 100 μL を加える。
7. 測定プレートをプレート密閉用シールでシールし、室温で 2 時間振とうする。
8. 7.の反応終了直前に OPD 錠を基質溶解液で溶解し、発色剤溶液を調製する。
9. 各ウエル中の液を除き、2.と同様の洗浄操作を合計 4 回行なう。
10. 各ウエルに発色剤溶液 100 μL を加え、室温で 20 分間反応させる。
11. 各ウエルに酵素反応停止液 100 μL を加える。
12. マイクロプレート用吸光度計にて 492 nm の吸光度を測定する。
    エストロン標準液の各濃度（6 ポイント）の測定値から標準曲線を作成し、検体の測定値を標準曲線に当てはめ、エストロン濃度を算出する。

Ⅴ． 操作上の注意

1. 検体は直ちに測定してください。直ちに測定できない場合は適宜小分けして、？ 30℃以下で凍結保存してください。検体の凍結融解を繰り返さないようにしてください。
2. 試薬は用時調製を原則としてください。特に、標準品、標識抗原および特異抗体は調製後、直ちに使用してください。なお、キットを分割使用する場合､調製後の標準品､標識抗原および特異抗体は適宜小分けして、－30℃以下で凍結保存してください。
3. 濃縮洗浄液は保存中に沈殿を生じることがありますが、この沈殿は希釈調製時に溶解します。
4. 各ウエルへの分注操作は測定精度に影響を与えますので正確に行なってください。また検体をウエルに注入する場合は、各検体ごとに新しいチップを用い、検体相互間の汚染がないように注意してください。標準液を希釈するときは、希釈段階ごとにかならず新しいチップを使ってください。
5. 5000 pg/mL を超える高値検体の場合は、検体を本キット添付の緩衝液にて希釈して測定してください。
6. 室温で反応中は必ずマイクロプレート用振とう器を用い振とうしてください（呈色反応は除く）。なお振とうはプレート密閉用シールに反応液がはねないようゆっくりと行なってください。
7. 測定はすべて２重測定で行なってください。
8. 酵素-基質反応停止後は、すみやかに吸光度の測定を行なってください。
9. 酵素基質の発色レベルは反応温度、時間、測定プレートの振とうの程度などでわずかですが影響を受けることがありますので、標準曲線は必ず測定ごとに作成してください。
10. 各試薬の保存もしくは使用中には、これらに強い光が当たらないように注意してください。
11. 本法による測定には、異なるロットのキットを組み合わせて使用しないでください。

Ⅵ． 基本性能

＜標準曲線の一例＞



＜添加回収試験＞

＜環境水A＞

Added Estrone (pg/ml)	Observed (pg/ml)	Expected (pg/ml)	Recovery (%)
0.0	4.08		
20.0	24.53	24.08	101.87
100.0	106.87	104.08	102.68
1000.0	904.85	1004.08	90.12

＜環境水 B＞

Added Estrone (pg/ml)	Observed (pg/ml)	Expected (pg/ml)	Recovery (%)
0.0	3.93		
20.0	24.49	23.93	102.34
100.0	93.56	103.93	90.02
1000.0	874.53	1003.93	87.11

＜環境水C＞

Added Estrone (pg/ml)	Observed (pg/ml)	Expected (pg/ml)	Recovery (%)
0.0	2.86		
20.0	24.12	22.86	105.51
100.0	92.72	102.86	90.14
1000.0	890.71	1002.86	88.82

＜培養液 A（フェノールレッド+）＞

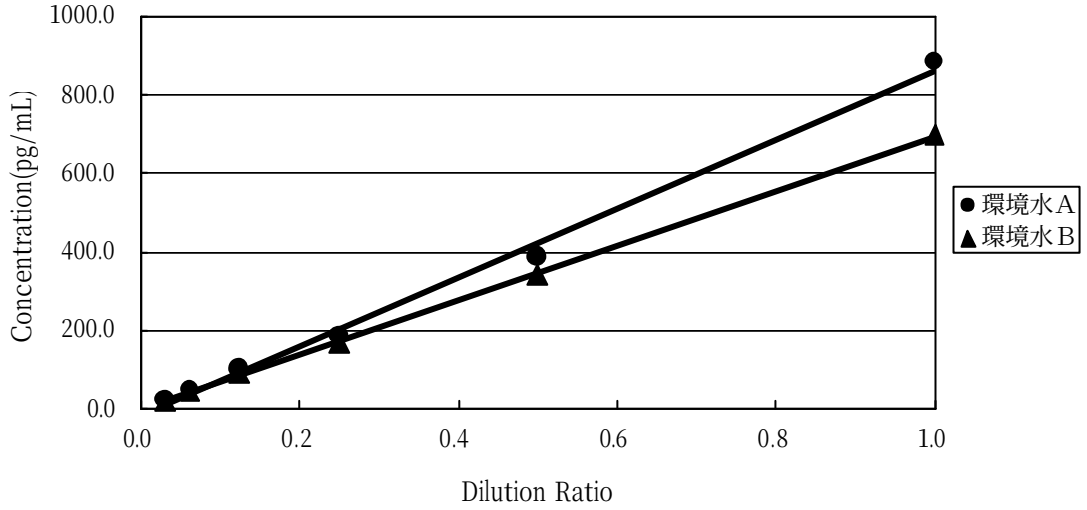
Added Estrone (pg/ml)	Observed (pg/ml)	Expected (pg/ml)	Recovery (%)
0.0	2.03		
20.0	19.37	22.03	87.93
100.0	85.49	102.03	83.79
1000.0	855.09	1002.03	85.34

＜培養液 B（フェノールレッド−）＞

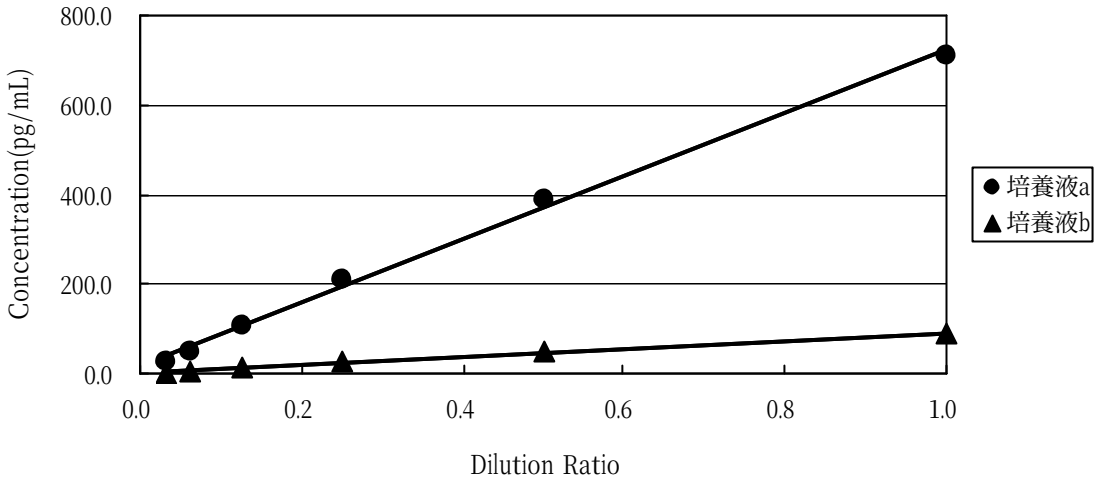
Added Estrone (pg/ml)	Observed (pg/ml)	Expected (pg/ml)	Recovery (%)
0.0	1.78		
20.0	20.16	21.78	92.56
100.0	107.25	101.78	105.37
1000.0	983.85	1001.78	98.21

＜希釈試験＞

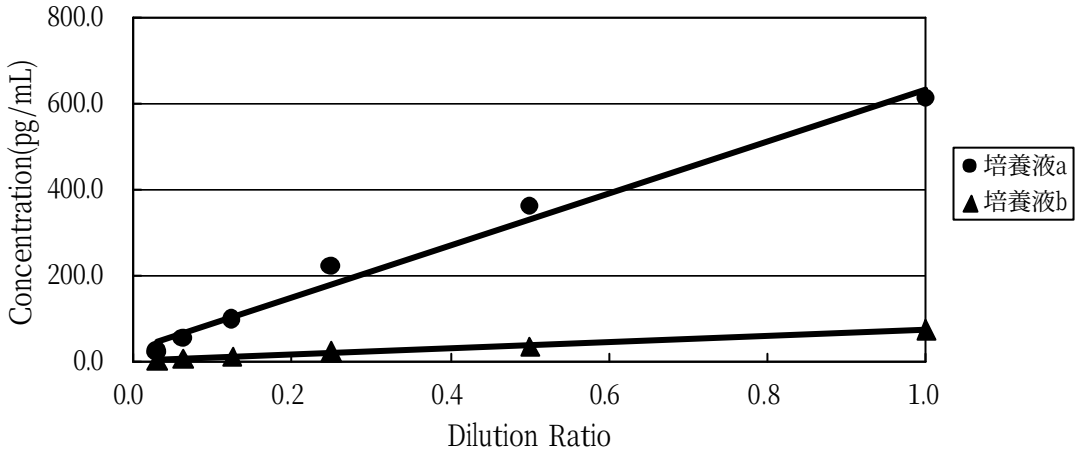
＜環境水＞



＜培養液 A（フェノールレッド＋）＞



＜培養液 B（フェノールレッド－）＞



＜交差反応性＞

化合物	交差反応性(%)
Estrone	100
17β-Estradiol	30.6
Estriol	0.4
Testosterone	＜0.0049
Progesterone	＜0.0049
4-Androstene-3,17-Dione	＜0.0049

＜再現性試験＞

同時再現性		日差再現性	
環境水	CV(%)	環境水	CV(%)
	5.75? 15.99		5.98? 14.50
培養液	CV(%)	培養液	CV(%)
	3.70? 15.59		4.90? 19.69

Ⅶ. 貯蔵法および有効期間

＜貯法＞

遮光し、2? 8℃にて保存してください。

＜有効期間＞

製造日より 24 ヶ月間（使用期限は外箱に表示）

＜包装＞

１キット 96 テスト分（標準曲線作成用を含む）

Ⅷ. 文　献

1. Nakada N. et al. (2004) Identification of estrogenic compounds in wastewater effluent. *Environ Toxicol Chem.* **23,** 2807-2815
2. Hashimoto S. et al. (2005) Horizontal and vertical distribution of estrogenic activities in sediments and waters from Tokyo Bay, Japan. *Arch Environ Contam Toxicol*. **48,** 209-216
3. Ohno K. et al. (2004) A novel nonradioactive method for measuring aromatase activity using a human ovarian granulosa-like tumor cell line and an estrone ELISA. *Toxicol. Sci.* **82**, 443-450.
4. Saitoh M. et al. (2001) Tributyltin or triphenyltin inhibits aromatase activity in the human granulosa-like tumor cell line KGN., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**,198-204
5. Nishi Y. et al.(2001) Establishment and characterization of a steroidogenic human granulosa-like tumor cell line, KGN, that expresses functional follicle-stimulating hormone receptor. *Endocrinology.* **142**, 437-445

6. Morinaga H. et al.(2004) A benzimidazole fungicide, benomyl, and its metabolite, carbendazim induce aromatase activity in human ovarian granulose-like tumor cell line (KGN). *Endocrinology.* **145,** 1860-1869
7. Takemura Y. et al.(2007) Metformin suppresses IL-1β-induced IL-8 production, aromatase activation and proliferation of endometriotic stromal cells. *J CLIN ENDOCRINOL METAB.* **92(8),** 3213-3218

＜お問合せ先＞
株式会社　矢内原研究所
〒418-0011　静岡県富士宮市粟倉 2480-1
FAX:0544-22-2770　TEL:0544-22-2771
www.yanaihara.co.jp　ask@yanaihara.co.jp
2008 年 1 月 11 日改訂